

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA AUGUSTA YAEGASHI PALUDO

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS COMO FONTE DE PECTINASES

CURITIBA

2016

PAOLA AUGUSTA YAEGASHI PALUDO

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS COMO FONTE DE PECTINASES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadoras: Prof^a. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Prof^a. Dra. Debora Brand

CURITIBA
2016

Paludo, Paola Augusta Yaegashi
Seleção de leveduras isoladas de uvas como fonte de pectinases / Paola Augusta Yaegashi Paludo -
Curitiba, 2016.
70 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Coorientadora: Professora Dra. Debora Brand
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências
da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Pectinases. 2. Leveduras autóctones. 3. Uvas. I. Bonfim, Tania Maria Bordin. II. Brand, Debora.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 663.2


TERMO DE APROVAÇÃO

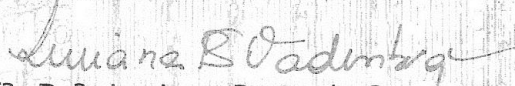
PAOLA AUGUSTA YAEGASHI PALUDO

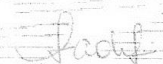
Título: "Seleção de leveduras isoladas de uvas como fonte de pectinases"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Drª. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora


Profª. Drª. Debora Brand
Co-orientadora


Profª. Drª. Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Universidade Federal do Paraná


Profª. Drª. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.

Aos meus pais, João Roberto Paludo e Maria do Carmo Akemi Yaegashi Paludo.
Continuaremos sonhando juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos seus professores, pela oportunidade de aprendizado.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Prof^a. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim e à Prof^a. Dra. Debora Brand, pela confiança na realização deste trabalho, pelo carinho, pela paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À Prof^a Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade, pelas sugestões e pela colaboração.

Ao Dr. Gildo Almeida da Silva e à Dra. Bruna Carla Agustini, pelo acolhimento na Embrapa Uva e Vinho e por possibilitarem as análises de identificação de leveduras por Biologia Molecular.

Às colegas do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Fernanda Gaensly, Rossana Calegari, Kamilla Schneider e Flávia Deffert, por todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À aluna de iniciação científica, Camila dos Santos Bernardo, pela colaboração na realização dos experimentos.

À todos os meus amigos, pelos conselhos, apoio e carinho.

Ao Paulo Cesar Sary Araujo, pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos dessa caminhada.

À minha irmã, Isabela Augusta Yaegashi Paludo, por estar sempre ao meu lado. Você foi fundamental nessa etapa da minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio em todas as minhas decisões, por serem meus maiores exemplos e meu porto seguro.

RESUMO

As pectinases, também denominadas enzimas pectolíticas, pectinolíticas ou pécticas, pertencem à família de polissacaridases que atuam na quebra das substâncias pécticas. Apresentam aplicações em diversos setores industriais, com destaque para a indústria de bebidas, na qual podem ser utilizadas para a clarificação e redução da viscosidade de sucos de frutas e no tratamento preliminar de suco de uva para a produção de vinho. As pectinases podem ser produzidas por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. As leveduras apresentam crescimento relativamente simples, geralmente produzem apenas um tipo de pectinase e usualmente não produzem pectina esterase. Assim, podem ser alternativas em relação à produção por fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná com ação pectolítica. Para isso, foi desenvolvida uma metodologia, com a determinação do meio de cultura, do reagente de precipitação, do tempo de contato com o reagente e do tempo para a leitura dos halos de degradação. A metodologia desenvolvida foi utilizada para a seleção de leveduras pectolíticas. A suspensão de cada levedura isolada foi inoculada de forma pontual em placas de Petri contendo o meio de cultura YNB-pectina. As placas recém-inoculadas foram colocadas em incubadora a 28 °C. Depois de 96 horas de crescimento, foi adicionada a solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, que permaneceu em contato com a superfície do meio de cultura por 30 minutos. Após 24 horas da adição do reagente, foi realizada a medida dos halos de degradação com paquímetro. Das 164 leveduras avaliadas, 58 apresentaram formação de halo de degradação. Os 7 isolados que apresentaram os diâmetros dos halos de degradação maiores que 10 mm foram selecionados e identificados como *Saccharomyces cerevisiae* por PCR-RFLP. Este foi o primeiro trabalho realizado para a verificação da produção de pectinases por leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná. As linhagens selecionadas podem ser de interesse para a produção de vinhos.

Palavras-chave: Pectinases. Leveduras autóctones. Uvas.

ABSTRACT

Pectinases, also denominated pectolytic, pectinolytic or pectic enzymes, belong to the family of polysaccharidases that breakdown pectic substances. These enzymes can be applied in several industrial sectors, especially in the beverage industry, where they can be used in clarification and reduction of viscosity of fruit juices and in preliminary treatment of grape juice for wine production. Pectinases can be produced by filamentous fungi, bacteria, and yeasts. The growth of yeasts is relatively simple, they generally produce only one type of pectinase, and usually do not produce pectin esterase. Yeasts pectinases can be an alternative to fungal pectinases. The aim of this study was to select yeasts isolated from grapes cultivated in the Paraná state with pectolytic action. An assay was developed evaluating the culture medium, the precipitating reagent, the contact time with the reagent, and the time for the measurement of the degradation halo. The assay was used for the selection of pectolytic yeasts. The suspension of each isolate was point-inoculated on plates containing YNB-pectin culture medium. The plates inoculated were incubated at 28 °C for 96 hours and then flooded with a 1% solution of hexadecyltrimethylammonium bromide, for 30 minutes. After 24 hours of the addition of the reagent, the degradation halo was measured with a paquimeter. Out of 164 yeasts evaluated, 58 showed formation of degradation halo. The seven isolates that showed degradation halos higher than 10 mm were selected and identified as *Saccharomyces cerevisiae* by PCR-RFLP. This is the first study realized to verify the pectinase production by yeasts isolated from grapes cultivated in Paraná state. The selected strains could be of interest in wine production.

Keywords: Pectinases. Autochthon yeasts. Grapes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA, COMPOSTA POR CELULOSE, HEMICELULOSE E SUBSTÂNCIA PÉCTICA, E DA LAMELA MÉDIA.....	17
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA PÉCTICA.....	19
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS ...	20
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA HOMOGALACTURONANA.....	21
FIGURA 5 - MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS DESESTERIFICANTES E ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES.....	26
FIGURA 6 - OPERAÇÕES UNITÁRIAS DO PROCESSAMENTO DE SUÇO DE FRUTAS.....	27
FIGURA 7 – HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-1137 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES REAGENTES.....	51
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	54
FIGURA 9 – HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA CONTROLE E POR LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS, DENOMINADAS NUMERICAMENTE COMO LEVEDURA 203, LEVEDURA 222 E LEVEDURA 244.....	56
FIGURA 10 - SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS DO ESTADO DO PARANÁ.....	58
FIGURA 11 – REAÇÕES DE PCR PARA AS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS SELECIONADAS	59
FIGURA 12 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS UTILIZANDO AS ENZIMAS <i>CfoI</i> e <i>HaeIII</i>	60

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE PECTINASES UTILIZADAS NA CLARIFICAÇÃO E FILTRAÇÃO DE SUCO E VINHO	29
QUADRO 2 – SOLUÇÕES DE REAGENTES UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TEORES DE SUBSTÂNCIA PÉCTICA EM FRUTAS E VEGETAIS.....	18
TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS	35
TABELA 3 – MEIOS DE CULTURA AVALIADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	42
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DA BASE DE NITROGÊNIO PARA LEVEDURAS (YNB)	43
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A REAÇÃO DE PCR	46
TABELA 6 - DIÂMETROS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-1137 APÓS A ADIÇÃO DOS REAGENTES.....	50
TABELA 7 - DIÂMETROS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-1137 APÓS DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM O BROMETO DE HEXADECIL TRIMETIL AMÔNIO 1%.....	52
TABELA 8 – CLASSIFICAÇÃO DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA POR LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS DO ESTADO DO PARANÁ.....	56

LISTA DE SIGLAS

ARS	- <i>Agricultural Research Service</i>
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HG	- Homogalacturonana
ITS	- Espaçadores internos transcritos (do inglês, <i>internal transcribed spacer</i>)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	- Polimetilgalacturonato esterase
PPase	- Protopectinase
PG	- Poligalacturonase
PGL	- Poligalacturonato liase
PL	- Polimetilgalacturonato liase
PMG	- Polimetilgalacturonase
RFLP	- Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, <i>restriction fragment lenght polymorphism</i>)
RG	- Ramnogalacturonana
XGA	- Xilogalacturonana
YEPD	- Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e glicose (do inglês, <i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>)
YNB	- Base de nitrogênio para leveduras (do inglês, <i>Yeast Nitrogen Base</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	17
3.2 PECTINASES	23
3.2.1 Protopectinases	24
3.2.2 Enzimas desesterificantes	24
3.2.3 Enzimas despolimerizantes	24
3.3 APLICAÇÕES DAS PECTINASES	26
3.3.1 Sucos de frutas e vinhos	27
3.3.2 Fermentação do café e do chá	29
3.3.3 Fabricação de papel	30
3.3.4 Extração de óleo	30
3.3.5 Ração animal	30
3.3.6 Indústria têxtil	30
3.4 OBTENÇÃO DE PECTINASES POR MICRO-ORGANISMOS	31
3.4.1 Leveduras pectolíticas isoladas de frutas ou resíduos de frutas	32
3.4.2 Propriedades bioquímicas das pectinases produzidas por leveduras	34
3.5 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	37
3.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39

4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	39
4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	39
4.3 ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS	40
4.4 CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS	40
4.5 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE LEVEDURAS	40
4.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	41
4.6.1 Determinação do meio de cultura, do reagente de precipitação e do tempo para a leitura dos halos de degradação	41
4.6.2 Determinação do tempo de contato com o reagente.....	44
4.7 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	44
4.8 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS SELECIONADAS	45
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	48
5.1.1 Determinação do meio de cultura.....	48
5.1.2 Determinação do reagente e do tempo para a leitura dos halos de degradação ..	49
5.1.3 Determinação do tempo de contato com o reagente.....	52
5.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS	54
5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA DAS LEVEDURAS SELECIONADAS	58
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas são polissacarídeos complexos presentes em células de vegetais superiores, compostos por resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Os grupos carboxílicos são parcialmente esterificados por grupos metilas e alguns dos grupos hidroxilas no C-2 e C-3 podem estar acetilados. Unidades de ramnose podem ser inseridas à cadeia principal e frequentemente cadeias laterais de arabinose, galactose ou xilose estão ligadas à elas (VRIES; VISSER, 2001; KASHYAP et al., 2001).

As pectinases são enzimas que atuam na quebra das substâncias pécticas. Podem ser classificadas em três grupos: protopectinases, enzimas desesterificantes e enzimas despolimerizantes (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Essas enzimas são amplamente empregadas na indústria alimentícia e outros setores industriais (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). Apresentam aplicações industriais na clarificação e extração de sucos de frutas, no tratamento preliminar de suco de uva para a produção de vinho, na fermentação do chá e do café, na fabricação de papel, na extração de óleo, na produção de ração animal e no processamento têxtil (IRSHAD et al., 2014).

As pectinases podem ser produzidas por diversos micro-organismos, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (PEDROLLI et al., 2009; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011; IRSHAD et al., 2014). Industrialmente, a produção ocorre principalmente pelo fungo *Aspergillus niger*, que produz vários tipos de pectinases, como a poligalacturonase, a pectina liase e a pectina esterase. Entretanto, essas preparações industriais não são puras, uma vez que apresentam outras atividades enzimáticas (celulase, hemicelulase, protease, esterase e glicosidade) que podem causar impactos negativos à qualidade do produto (BLANCO et al., 1999; GUMMADI; PANDA, 2003; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). As pectinases produzidas por leveduras podem ser uma alternativa em relação à produção por fungos filamentosos. As leveduras são unicelulares, seu crescimento é relativamente simples, geralmente produzem apenas um tipo de pectinase e usualmente não produzem pectina esterase (BLANCO et al., 1999;

ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). As pectinases produzidas por leveduras apresentam potencial aplicação na clarificação de sucos de frutas e de vinhos, sem que ocorra a liberação de metanol (POONDLA et al., 2015).

As frutas são um importante micro-habitat para uma variedade de espécies de leveduras devido à sua alta concentração de açúcar, baixo pH e presença de insetos como vetores. Dessa forma, constituem um meio interessante para a seleção de leveduras pectolíticas (SILVA et al., 2005; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Este trabalho de mestrado está vinculado ao Programa de Extensão “Desenvolvimento e transferência de tecnologia para melhoria dos produtos da uva visando o fortalecimento da comunidade produtora” (PROEC 90/09) e apresentou como objetivo a seleção de leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná com ação pectolítica. O emprego de leveduras pectolíticas pode contribuir para a produção de vinhos por vitivinicultores do estado do Paraná, com a geração de renda e fortalecimento da comunidade produtora.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi selecionar leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná com ação pectolítica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

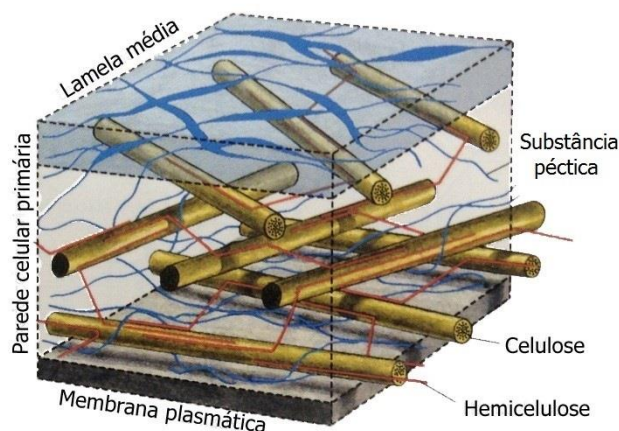
- Desenvolver uma metodologia para a seleção de leveduras pectolíticas, com a determinação do meio de cultura, do reagente de precipitação, do tempo de contato com o reagente e do tempo para a leitura dos halos de degradação;
- Selecionar leveduras pectolíticas por meio da metodologia desenvolvida;
- Identificar as leveduras selecionadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que estão presentes nas células de vegetais superiores. Constituem a parede celular primária e são os principais componentes da lamela média, uma fina camada de material adesivo que une a parede celular primária de células adjacentes (Figura 1) (ALKORTA et al., 1998; PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA, COMPOSTA POR CELULOSE, HEMICELULOSE E SUBSTÂNCIA PÉCTICA, E DA LAMELA MÉDIA



FONTE: Adaptada de RAVEN; EVERT; EICHHORN (2007).

Entre as funções apresentadas pelas substâncias pécticas estão as estruturais, de barreira contra o ambiente externo, de adesão entre células adjacentes e o envolvimento nas interações com os patógenos e na textura de frutas e vegetais (ALKORTA et al., 1998; GUMMADI; PANDA, 2003; HARHOLT; SUTTANGKAKKUL; SCHELLER, 2010). Além disso, conferem propriedades plásticas e de flexibilidade à parede celular, uma condição necessária para a sua expansão durante o crescimento celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A composição dos polissacarídeos na parede celular dos vegetais varia de acordo com a sua fonte, localização e fatores ambientais (PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003). A Tabela 1 apresenta os teores de substância péctica em algumas frutas e vegetais.

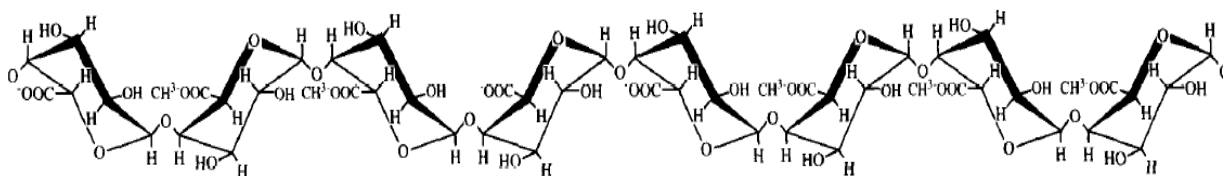
TABELA 1 - TEORES DE SUBSTÂNCIA PÉCTICA EM FRUTAS E VEGETAIS

Fruta/Vegetal	Tecido	Substância péctica (%)
Banana	Fresco	0,7-1,2
Cereja	Fresco	0,2-0,5
Ervilha	Fresco	0,9-1,4
Maçã	Fresco	0,5-1,6
Morango	Fresco	0,6-0,7
Pêssego	Fresco	0,1-0,9
Uva	Fresco	0,2-0,6
Batata	Matéria seca	1,8-3,3
Cenoura	Matéria seca	6,9-18,6
Polpa de beterraba	Matéria seca	10,0-30,0
Polpa de laranja	Matéria seca	12,4-28,0
Tomate	Matéria seca	2,4-4,6

FONTE: Adaptada de JAYANI; SAXENA; GUPTA (2005) e RIBÉREAU-GAYON et al. (2006).

As substâncias pécticas apresentam heterogeneidade em relação à sua estrutura química e peso molecular (PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003). Quimicamente, podem ser definidas como um complexo coloidal de heteropolissacarídeos, composto por resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Os grupos carboxílicos são parcialmente esterificados por grupos metilas e parcialmente ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Alguns dos grupos hidroxilas no C-2 e C-3 podem estar acetilados. Unidades de ramnose podem ser inseridas à cadeia principal e frequentemente cadeias laterais de arabinose, galactose ou xilose estão ligadas à elas (Figura 2) (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA PÉCTICA

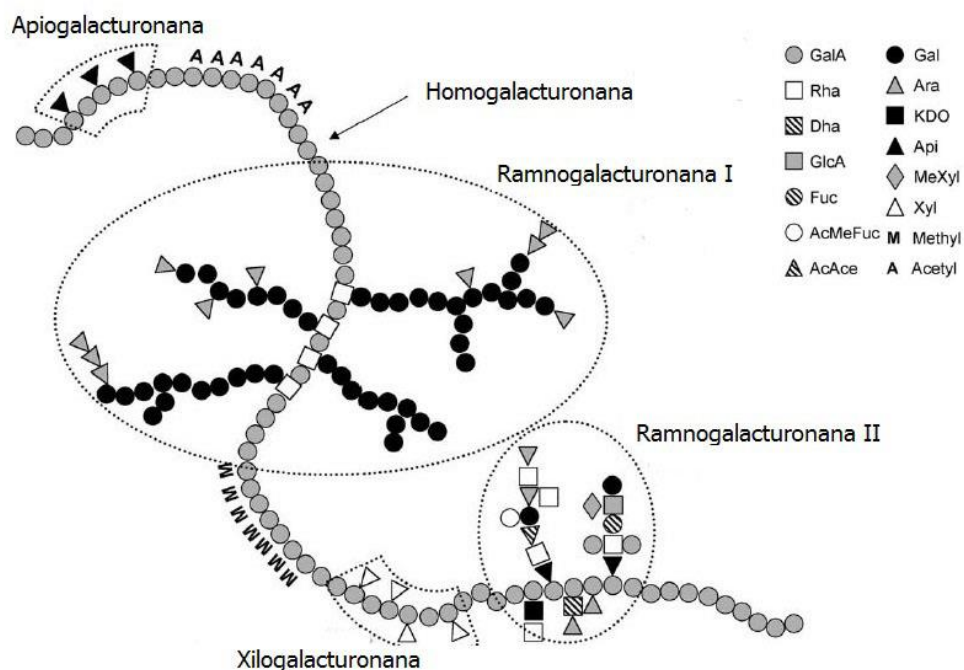


FONTE: ALKORTA et al. (1998).

NOTA: NÃO ESTÃO INCLUÍDOS RESÍDUOS DE RAMNOSE, GALACTOSE, ARABINOSE E XILOSE.

A Figura 3 representa a estrutura dos principais polissacarídeos pécticos: homogalacturonana (HG), xilogalacturonana (XGA), apiogalacturonana, ramnogalacturonana I (RGI) e ramnogalacturonana II (RGII). Tipicamente, homogalacturonana é o polissacarídeo mais frequente, constituindo aproximadamente 65% da substância péctica, enquanto ramnogalacturonana I constitui de 20 a 35% e xilogalacturonana e ramnogalacturonana II constituem uma quantidade inferior a 10% (HARHOLT; SUTTANGKAKKUL; SCHELLER, 2010). A representação esquemática das substâncias pécticas assume que os domínios estão ligados covalentemente (VRIES; VISSER, 2001; PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

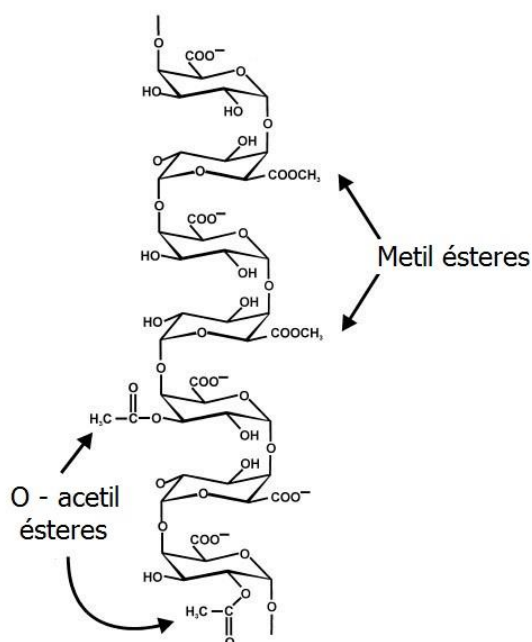


FONTE: PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO (2003).

LEGENDA: GalA: ácido D-galacturônico, Rha: ramnose, Dha: ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico, GlcA: ácido glucurônico, Fuc: fucose, AcMeFuc: acetilmetilfucose, AcAce: ácido acérico, Gal: galactose, Ara: arabinose, KDO: ácido 3-deoxi-mano-2-octulosônico, Api: apiose, MeXyl: metil-xilose, Xyl: xilose, Methyl: metil, Acetyl: acetil.

A homolacturonana, também chamada de região lisa ou *smooth region*, consiste em um polímero de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, os quais podem ser metil-esterificados no C-6 ou acetil-esterificados no C-2 ou C-3 (Figura 4) (VRIES; VISSER, 2001).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DA HOMOGALACTURONANA



FONTE: RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN (2001).

Os resíduos de ácido D-galacturônico podem ser substituídos por xilose (xilogalacturonana) ou apiofuranose (apiogalacturonana). Na xilogalacturonana, a xilose liga-se ao C-3 dos resíduos de ácido D-galacturônico. Outros resíduos de xilose podem ser ligados ao primeiro grupo xilose, por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

Ramnogalacturonana I consiste em um polímero do dissacarídeo formado por resíduos de ácido D-galacturônico e resíduos de ramnose. Arabinana, arabinogalactana e galactana podem estar presentes como cadeias laterais (VRIES; VISSER, 2001; PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Ramnogalacturonana II é um polissacarídeo de aproximadamente 30 monossacarídeos, que apresenta uma cadeia principal de resíduos de ácido D-galacturônico substituída por quatro cadeias laterais. Essas cadeias laterais apresentam diversos açúcares, como o ácido acérico, o ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico e o ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico (VRIES; VISSER, 2001; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011; CANTERI et al.,

2012). Ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II podem ser denominadas como região ramificada ou *hairy region* (PEDROLLI et al., 2009).

A Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*) classificou as substâncias pécticas em protopectinas, ácidos pécticos, ácidos pectínicos e pectinas, de acordo com o grau de esterificação que apresentam (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

As protopectinas estão presentes nos tecidos vegetais intactos e por hidrólise produzem ácidos pectínicos ou pectina. O ácido péctico é o polímero de galacturonana em que os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil ésteres. Os sais de ácido péctico são chamados de pectatos. O ácido pectínico é o polímero de galacturonana que contém entre 0 e 75% de grupos metil ésteres. Sais de ácidos pectínicos são chamados de pectinatos. Pectina é o polímero que apresenta quantidade superior a 75% de grupos metil ésteres (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). O termo “pectina” é frequentemente utilizado para designar todos os tipos de substâncias pécticas (IRSHAD et al., 2014). As protopectinas são insolúveis em água e as demais substâncias pécticas são totalmente ou parcialmente solúveis em água (ALKORTA et al., 1998).

A capacidade de geleificação da substância péctica depende do grau de esterificação, massa molar, pH, grau de amidação e presença de açúcares ou outros solutos (CANTERI et al., 2012). Substâncias pécticas com poucos grupos metil ésteres não são capazes de formar géis eficientemente, no entanto a adição de cátions divalentes como os íons cálcio é capaz de aumentar a geleificação (IRSHAD et al., 2014).

As substâncias pécticas apresentam aplicações na indústria alimentícia como agentes espessantes e estabilizantes em doces, geléias, compotas, preparações de frutas para iogurtes, bebidas, sucos de frutas concentrados, entre outros (CANTERI et al., 2012; ADAPA et al., 2014). Além disso, integram o grupo das fibras dietéticas, com benefícios para o equilíbrio hídrico e motilidade intestinal, e possuem efeitos prebióticos. A cadeia péctica pode ser transformada em ácidos graxos de cadeia curta (acético, butírico e propiônico) e dióxido de carbono pela ação de bactérias produtoras

de pectinases dos gêneros *Aerobacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Enterococcus* (CANTERI et al., 2012).

3.2 PECTINASES

As pectinases, também denominadas enzimas pectolíticas, pectinolíticas ou pécticas, pertencem à família de polissacaridases que atuam na quebra das substâncias pécticas (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). As substâncias pécticas apresentam variedade estrutural, e da mesma forma, as pectinases apresentam diversas formas estruturais e mecanismos de ação (GUMMADI; PANDA, 2003).

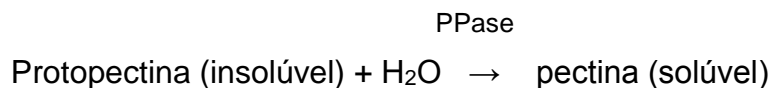
Essas enzimas atuam em virtude de questões nutricionais e são responsáveis pela patogênese das plantas (GUMMADI; PANDA, 2003). Agentes patogênicos podem causar a degradação das substâncias pécticas nas plantas, com a formação de oligogalacturonídeos que participam da cascata de sinalização celular (HARHOLT; SUTTANGKAKKUL; SCHELLER, 2010). Além disso, participam da extensão da parede celular, da modificação das substâncias pécticas durante o amadurecimento de frutas e da deteriorização de frutas e vegetais (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Estudos indicam que o amadurecimento de frutos é um processo ordenado que inclui o relaxamento da parede celular e a degradação da hemicelulose, seguida pela despolimerização da pectina (CANTERI et al., 2012). Em frutas não maduras, as substâncias pécticas estão ligadas às microfibrilas de celulose, o que confere rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, enzimas alteram a cadeia principal ou as cadeias laterais da substância péctica, que assim se torna uma molécula mais solúvel (KASHYAP et al., 2001).

A classificação das pectinases ocorre de acordo com o substrato, o mecanismo de ação (hidrólise ou eliminação) e o padrão de ação que apresentam (randômico ou terminal) (KASHYAP et al., 2001). Basicamente existem três tipos de enzimas: protopectinases, desesterificantes e despolimerizantes (ALKORTA et al., 1998).

3.2.1 Protopectinases

A protopectinase (PPase) catalisa a solubilização da protopectina em pectina. Pode ser classificada em dois tipos: protopectinase do tipo A, que reage com o sítio interno, ou seja, a região do ácido poligalacturônico da protopectina, e protopectinase do tipo B, que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem conectar a cadeia de ácido poligalacturônico e os constituintes das paredes celulares (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA 2005; UENOJO; PASTORE, 2007). As protopectinases apresentam pouco interesse industrial (UENOJO; PASTORE, 2007). O mecanismo de ação dessas enzimas está representado a seguir.



3.2.2 Enzimas desesterificantes

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PE) catalisa a hidrólise dos grupos metil ésteres da pectina, convertendo pectina em ácido péctico (Figura 5, a) e liberando metanol. Atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

3.2.3 Enzimas despolimerizantes

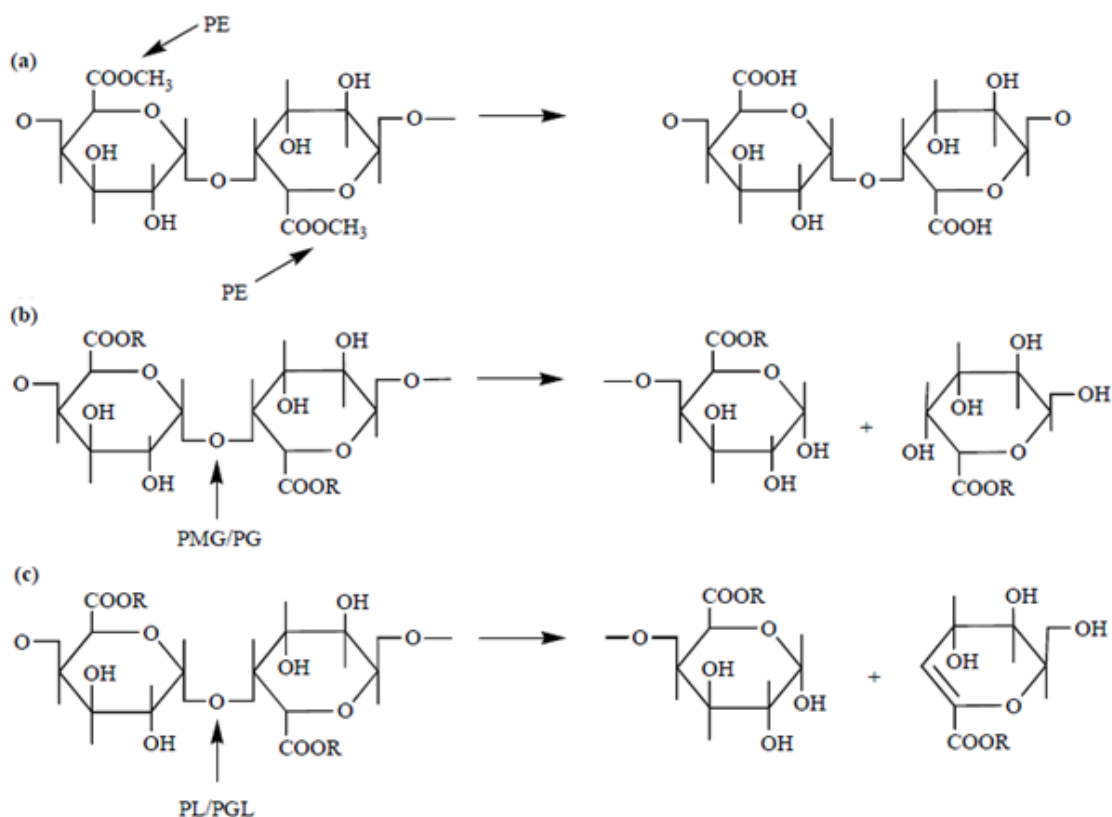
As enzimas despolimerizantes catalisam a clivagem das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ do ácido D-galacturônico das substâncias pécticas por hidrólise (hidrolases) (Figura 5, b) e β -eliminação (liases) (Figura 5, c) (ALKORTA et al., 1998; UENOJO; PASTORE, 2007). Na hidrólise ocorre a introdução de uma molécula de água, já na β -eliminação não ocorre a participação de água (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases (PMG) e as poligalacturonases (PG). A polimetilgalacturonase catalisa a clivagem hidrolítica das

ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ da pectina e pode ser classificada como endo-polimetilgalacturonase ou exo-polimetilgalacturonase. Já a poligalacturonase catalisa a hidrólise das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ do ácido péctico e pode ser classificada como endo-poligalacturonase ou exo-poligalacturonase (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

As liases, também chamadas de transeliminases, clivam as ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre o carbono 4 e 5 no terminal não redutor do ácido galacturônico formado. Incluem a pectina liase e o pectato liase. A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PL) catalisa a clivagem da pectina, de modo endo ou exo. O pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem do ácido péctico, de modo endo ou exo (ALKORTA et al., 1998; UENOJO; PASTORE, 2007).

FIGURA 5 - MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS DESESTERIFICANTES E ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES



FONTE: Adaptada de PEDROLI et al. (2009).

LEGENDA: (a) PE

(b) R = H para PG e CH₃ para PMG

(c) R = H para PGL e CH₃ para PL

PE: polimetilgalacturonato esterase, PMG: polimetilgalacturonase, PG: poligalacturonase, PL: polimetilgalacturonato liase, PGL: poligalacturonato liase.

3.3 APLICAÇÕES DAS PECTINASES

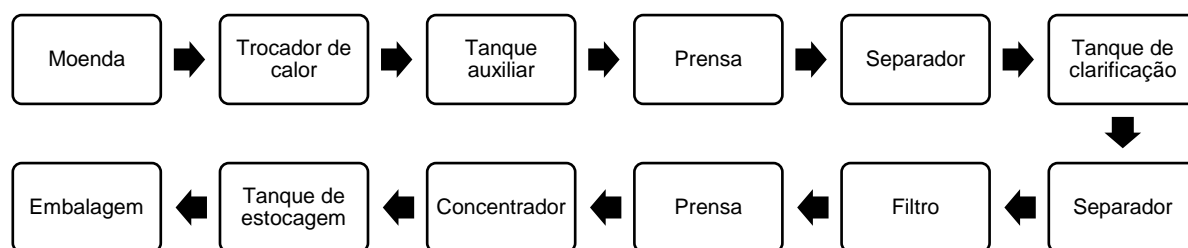
Pectinases são amplamente empregadas na indústria alimentícia e outros setores industriais. Nas últimas 7 décadas, essas enzimas vêm sendo utilizadas no processamento de sucos e de vinhos (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). Diversas companhias na Europa (Novo Nordisk, Miles Kali-Chemie, Swiss Ferment Co., Novartis, Roche), Estados Unidos (Miles Laboratories, Rohm and Raas Co.) e no Japão (Kikkoman Shoyu Co.) produzem pectinases e preparações comerciais de pectinases (UENOJO; PASTORE, 2007). Em 2011, este mercado

representou 5% das vendas de enzimas (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

3.3.1 Sucos de frutas e vinhos

O processamento do suco de frutas é constituído pelas operações unitárias descritas pela Figura 6.

FIGURA 6 - OPERAÇÕES UNITÁRIAS DO PROCESSAMENTO DE SUCO DE FRUTAS



FONTE: Adaptada de VITOLO (2015).

As enzimas são adicionadas no tanque auxiliar para a eliminação da pectina insolúvel e no tanque de clarificação para redução da viscosidade do suco, para remoção do amido residual e para facilitar a floculação de substâncias insolúveis (VITOLO, 2015).

A prensagem de frutas ricas em substâncias pécnicas produz um suco com alta viscosidade, consistência e turbidez, devido à presença de partículas insolúveis. Essas partículas, chamadas de *cloud particles*, apresentam um núcleo protéico com carga positiva e são encobertas por substâncias pécnicas carregadas negativamente. Essa carga negativa faz com que haja repulsão de cargas. As pectinases podem ser utilizadas para a clarificação de sucos de frutas, ou seja, para a degradação das substâncias pécnicas, expondo parte da proteína carregada positivamente. Assim, ocorre a redução da repulsão eletrostática entre as partículas, possibilitando que haja agregação em partículas maiores e sedimentação das mesmas. Por fim, é necessária centrifugação seguida de filtração, para que haja um suco com a aparência desejada (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001). Dessa forma, a clarificação é um

processo bifásico, no qual a pectinase quebra as substâncias pécticas (1ª fase) e em seguida as micelas desarranjadas se aglutinam, por meio da interação eletrostática (2ª fase) (VITOLLO, 2015). Além da aplicação na clarificação, as pectinases são capazes de aumentar o sabor, a cor e o valor nutricional dos sucos (IRSHAD et al., 2014).

As etapas pré-fermentativas da produção de vinho são semelhantes às da produção de suco de uva (VITOLLO, 2015). Assim como na produção de sucos, durante a produção de vinhos ocorre a liberação de parte das substâncias pécticas da baga, devido ao esmagamento e à prensagem da uva, com a formação de uma malha coloidal. A quebra das substâncias pécticas da uva por pectinases é a forma mais eficiente para a garantia da qualidade do vinho. A ocorrência de atividade de poligalacturonase e pectina esterase em uvas já foi reportada, no entanto essa atividade é insuficiente para promover a clarificação. Preparações comerciais de pectinases podem ser adicionadas para a clarificação e filtração de vinhos (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). O Quadro 1 mostra as preparações comerciais de pectinases que são comumente utilizadas.

QUADRO 1 - PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE PECTINASES UTILIZADAS NA CLARIFICAÇÃO E FILTRAÇÃO DE SUCO E VINHO

Preparações comerciais de pectinases
Pectinex (Novozymes)
Ultrazym 100 G (Novo Nordisk)
Novoclair Speed (Novo Nordisk)
Rapidase Filtration (DMS)
Rapidase Vinosuper (DMS)
Vinoflow G (Novo Nordisk)
Rapidase CB (DMS)
Rapidase CR (DMS)
Lallzyme C (Lallemand)
White-style (Lallemand)
Zimopec PX1 (Perdomini)
Endozym Active (AEB)
Endozym Glucalyse (AEB)
Endozym Glucapec (AEB)
Endozym ICS 10 Éclair (AEB)
Endozym TMO (AEB)

FONTE: MORENO-ARRIBAS; POLO (2009), KASHYAP et al. (2001).

A pectinase, utilizada concomitantemente com a celulase e hemicelulase, apresenta como vantagens: melhoria na maceração da casca, aumento da extração de pigmentos e de compostos aromáticos, aumento da clarificação e filtração do mosto e melhoria da qualidade e estabilidade do vinho (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1998; BHAT, 2000; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

3.3.2 Fermentação do café e do chá

O processamento do café envolve o despulpamento, a fermentação e a secagem dos grãos. O objetivo da fermentação do café é a remoção da camada de mucilagem do grão, que é constituída majoritariamente por substâncias pécticas, pela ação de pectinases. Celulases e hemicelulases, presentes nas preparações comerciais, auxiliam na degradação da mucilagem (KASHYAP et al., 2001; HOONDAL et al., 2002; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; MASOUD; JESPERSEN, 2006).

As pectinases são utilizadas na fermentação do chá para acelerar o processo e diminuir a formação de espuma de pós instantâneos (KASHYAP et al., 2001; HOONDAL et al., 2002; JAYANI; SAXENA; GRUPTA, 2005).

3.3.3 Fabricação de papel

Durante a fabricação de papel, as pectinases podem realizar a quebra das substâncias pécticas e diminuir a demanda catiônica das soluções pécticas e do filtrado resultante do branqueamento com peróxido (KASHYAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

3.3.4 Extração de óleo

As pectinases eliminam as propriedades emulsificantes das substâncias pécticas, que interferem na extração de óleo (JAYANI et al., 2005).

3.3.5 Ração animal

Pectinases, glucanases, xilanases, proteinases e amilases são utilizadas na produção de ração animal. Essas enzimas reduzem a viscosidade da ração, o que permite o aumento da absorção e a liberação de nutrientes, por meio da hidrólise de fibras não biodegradáveis ou pela liberação de nutrientes bloqueados por essas fibras (BLANCO et al., 1999; HOONDAL et al., 2002).

3.3.6 Indústria têxtil

Na indústria têxtil, as pectinases são utilizadas em conjunto com amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas para a remoção de impurezas não celulósicas (HOONDAL et al., 2002).

3.4 OBTENÇÃO DE PECTINASES POR MICRO-ORGANISMOS

Diversos micro-organismos são capazes de produzir pectinases, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (PEDROLLI et al., 2009; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011; IRSHAD et al., 2014). Essas enzimas podem ser classificadas como pectinases ácidas ou alcalinas. A primeira classe é frequentemente produzida por fungos, como *Aspergillus niger*, enquanto a segunda classe é produzida principalmente por bactérias, especialmente por *Bacillus* spp (KASHYAP et al., 2001; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

A síntese de pectinases é influenciada pela composição do meio de cultura, particularmente a fonte de carbono, pela presença de indutores e pelas condições de cultivo, como pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação (UENOJO; PASTORE, 2007; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Já foi descrita a produção de pectinases por diversas leveduras, como *Kluyveromyces marxianus* (BARNBY; MORPETH; PYLE, 1990; SCHWAN; COOPER; WHEALS, 1997; SILVA et al., 2005), *Saccharomyces chevalieri*, *Torulopsis candida*, *Candida norvegensis*, *Kluyveromyces fragilis* (SANCHEZ; GUIRAUD; GALZ, 1984), *Cryptococcus albidus* (FEDERICI, 1985), *Kluyveromyces wickerhamii* (YOSHITAKE et al., 1994; SILVA et al., 2005), *Stephanoascus smithiae*, *Pichia angusta*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Stephanoascus smithiae*, *Candida krusei*, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Zygosaccharomyces cidri*, *Candida pseudoglebosa*, *Debaryomyces polymorphus*, *Candida intermedia*, *Debaryomyces hansenii* (SILVA et al., 2005), *Rhodotorula* sp. (VAUGHN et al., 1969), *Saccharomyces fragilis* (LUH; PHAFF, 1954; LIM et al., 1980), *Saccharomyces cerevisiae* (BLANCO et al., 1997; SCHWAN; COOPER; WHEALS, 1997; GAINVORS et al., 2000; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004), entre outras.

Industrialmente, a produção de pectinases ocorre principalmente pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*, que produz endo e exo-poligalacturonase, pectina liase e pectina esterase. Entretanto, essas preparações industriais não são puras, uma vez que apresentam outras atividades enzimáticas (celulase, hemicelulase, protease,

esterase e glicosidade) que podem causar impactos negativos à qualidade do produto (BLANCO et al., 1999; GUMMADI; PANDA, 2003; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

As pectinases produzidas por leveduras podem ser alternativas em relação à produção por fungos filamentosos. As leveduras são unicelulares, seu crescimento é relativamente simples, geralmente produzem apenas um tipo de pectinase e usualmente não produzem pectina esterase (BLANCO et al., 1999; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). As pectinases produzidas por leveduras apresentam potencial aplicação na clarificação de sucos de frutas e de vinhos, sem que haja a liberação de metanol. Além disso, as pectinases produzidas por leveduras não são misturas, diferente do que já foi reportado por bactérias e fungos filamentosos (POONDLA et al., 2015). *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* são os gêneros de leveduras mais estudados e parecem ser promissores para a produção de pectinases (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

3.4.1 Leveduras pectolíticas isoladas de frutas ou resíduos de frutas

As frutas são um importante micro-habitat para uma variedade de espécies de leveduras devido à sua alta concentração de açúcar, baixo pH e presença de insetos como vetores. Dessa forma, constituem um meio interessante para a seleção de leveduras pectolíticas (SILVA et al., 2005; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Strauss et al. (2001) investigaram os tipos de enzimas que são produzidas por leveduras não *Saccharomyces* isoladas de uvas de vinhedos da África do Sul e de suco de uva clarificado. A produção de pectinases foi verificada em nove dos 245 isolados, incluindo as espécies: *Candida stellata*, *Candida oleophila*, *Candida pulcherrima*, *Candida valida* e *Kloeckera apiculata*.

Silva et al. (2005) avaliaram a produção de pectinases por 300 leveduras isoladas de frutas tropicais. Apenas 21 leveduras (7%) apresentaram atividade de poligalacturonase, e dentre estas apenas 7 apresentaram atividade de pectina liase. Nenhum dos isolados foi capaz de secretar pectina esterase. As leveduras pectolíticas

identificadas por este trabalho pertenciam a seis gêneros diferentes: *Kluyveromyces*, *Stephanoascus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Debaryomyces*.

Padma, Anuradha e Reddy (2011) isolaram micro-organismos a partir de solos ou frutas em decomposição e os selecionaram de acordo com a sua capacidade de produzir pectinases. As seis leveduras selecionadas foram avaliadas quanto à produção de poligalacturonase a 25 °C e 5 °C. O isolado que apresentou maior atividade na temperatura de 5 °C foi identificado como *Saccharomyces cerevisiae* e foi utilizado na produção de pectinases utilizando substratos contendo pectina, como a casca de laranja, casca de maçã, casca de manga e mosto de uva.

Merín et al. (2011) avaliaram a capacidade de produção de pectinases de leveduras isoladas de uvas. As leveduras selecionadas foram analisadas em condições relacionadas à vinificação (pH e temperatura). Os 10 isolados que apresentaram as maiores atividades a baixas temperaturas (12 °C) foram identificados como *Aureobasidium pullulans*.

Merín et al. (2013), selecionaram as leveduras isoladas a partir de uvas e de superfícies de equipamentos de vinícolas com capacidade de produzir pectinases. Dentre os 78 isolados, apenas nove apresentaram atividade de pectinase. As leveduras foram identificadas como *Aureobasidium pullulans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Filobasidium capsuligenum*. A produção dessas enzimas também foi avaliada em condições relacionadas com a vinificação (pH 3,5 e temperatura de 12 e 28 °C) e os resultados obtidos mostraram que existe uma potencial aplicação na produção de vinho.

Lorenzo et al. (2013) utilizaram o bagaço de uva como fonte de leveduras para a produção de pectinases, amilases, celulasas, lipases, proteases e xilanases. Para a produção de Grappa, o bagaço de uva precisa ser estocado por certo período para permitir a fermentação dos açúcares disponíveis em álcool e outros compostos voláteis. Dessa forma, açúcares como glucose e frutose, são utilizados nos primeiros dias de fermentação, e assim, as leveduras desse habitat devem utilizar outras fontes de carbono. A ocorrência de leveduras produtoras de pectinases e celulasas está de acordo com essa hipótese. Foram isoladas 220 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e 180 linhagens de leveduras não *Saccharomyces*. Somente 11 linhagens de

Saccharomyces cerevisiae apresentaram atividade de pectinase. Todas as leveduras pectolíticas apresentaram valor de pH ótimo entre 3,5 e 5,5, e assim apresentaram potencial aplicação em diversos segmentos como a produção de Grappa, de vinho (pH 3,0-4,5) e de café (pH 4,3-6,0).

Poondla et al. (2015) isolaram leveduras de resíduos de frutas e selecionaram as leveduras capazes de produzir pectinases. Apenas cinco leveduras isoladas apresentaram atividade de pectinase. O isolado que apresentou a maior atividade foi identificado como *Saccharomyces cerevisiae* e apresentou-se como potencial fonte de pectinases para a utilização em alimentos e bebidas.

3.4.2 Propriedades bioquímicas das pectinases produzidas por leveduras

O conhecimento das propriedades bioquímicas das pectinases é importante para a sua aplicação. A estabilidade dessas enzimas é afetada por parâmetros físicos, como o pH e a temperatura, e por parâmetros químicos, como a presença de inibidores e ativadores (GUMMADI; PANDA, 2003).

As pectinases produzidas por leveduras geralmente são enzimas extracelulares e apresentam natureza glicoproteica (BLANCO et al., 1999).

Na Tabela 2 estão apresentadas as propriedades bioquímicas de poligalacturonases produzidas por leveduras. Os dados demonstram que apresentam pH ótimo entre 3,5 e 6,0, temperatura ótima entre 25 e 60 °C e peso molecular e K_m variáveis. A variação apresentada pelos valores de K_m indicam diferentes afinidades pelo substrato.

TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS

(continua)

Micro-organismo	Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (kDa)	Km (mg/mL)	Referência
<i>Candida norvegensis</i>	PG	5,0	50			SANCHEZ; GUIRAUD; GALZ, 1984
<i>Cryptococcus albidus</i>	PG	3,75 (4,0-8,0)	37	41	0.57	FEDERICI, 1985
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS1555	PG	5,0	50-60			SANCHEZ; GUIRAUD; GALZ, 1984
<i>Kluyveromyces marxianus</i> linhagem 166	PG	5,5 (4,0-6,0)	35			SILVA et al., 2005
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT3172	PG	5,0 (4,0-6,0)	40			SCHWAN; COOPER; WHEALS, 1997
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	PG - isoforma I			49.6		BARNBY; MORPETH; PYLE, 1990
	PG - isoforma II			49.6		
	PG - isoforma III			46.7		
	PG - isoforma IV			49.6		
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> linhagem 185	PG	4,5 (4,0-6,0)	35			SILVA et al., 2005
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> IFO 1675	PG	5,2 (4,0-7,0)	50			YOSHITAKE et al., 1994
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1389	PG-1	5,0	45	22	1.8	BLANCO et al., 1997
	PG-2	4.5	45	31	14.08	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC28583	PG	4,0 (3,0-5,0)	25	42		GAINVORS et al., 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IM1-8b	PG	4.5	45	36	0.59	BLANCO et al., 1997
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UCLMS-39	PG	3,5-5,5	50			FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> CCT1698	PG	4,5	30			SCHWAN; COOPER; WHEALS, 1997
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	PG	5,0	25			SANCHEZ; GUIRAUD; GALZ, 1984

TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS POLIGALACTURONASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS

(conclusão)

Micro-organismo	Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Peso molecular (kDa)	Km (mg/mL)	Referência
<i>Saccharomyces fragilis</i>	PG-1	4,0-5,0 (3,5-6,0)	46	50	0.31	LIM et al., 1980
	PG-2	4,0-5,0 (3,5-6,0)	50	50	0.23	
	PG-3	4,0-5,0 (3,5-6,0)	30	50	0.5	
<i>Saccharomyces fragilis</i>	PG	4,4 (3,5-5,5)	50			LUH; PHAFF, 1953
<i>Rhodotorula</i> sp.	PG	6,0 (4,0-9,0)	40			VAUGHN et al., 1969
<i>Torulopsis cândida</i>	PG	5,0	60			SANCHEZ; GUIRAUD; GALZ, 1984

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: PG: poligalacturonase

3.5 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

A seleção de leveduras pectolíticas pode ser realizada com o emprego de métodos qualitativos ou semi-quantitativos, pelo cultivo das leveduras em meio sólido seguido da adição de reagentes que precipitam a pectina intacta no meio. Assim, os halos de degradação formados ao redor das colônias indicam a degradação da pectina (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Os meios de cultura empregados geralmente consistem em um meio mineral contendo pectina ou ácido poligalacturônico (SILVA et al., 2005; SAHAY et al., 2013). Alguns trabalhos incluem a glicose no meio de cultura (STRAUSS et al., 2001; MASOUD; JESPERSEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; LORENZO et al., 2013).

As soluções de reagentes de precipitação frequentemente utilizadas são: solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1% (BIELY; SLÁVIKOVÁ, 1994; BUZZINI; MARTINI, 2002; SILVA et al., 2005), solução de vermelho de rutênio 0,1% (STRAUSS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; PADMA; ANURADHA; REDDY, 2011; POONDLA et al., 2015), solução de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ (MASOUD; JESPERSEN, 2006; LORENZO et al., 2013) e solução de lugol (MERÍN et al., 2011; SAHAY et al., 2013).

Trabalhos reportados na literatura com a finalidade de selecionar leveduras pectolíticas empregam diferentes meios de cultura, soluções de reagentes e condições de ensaio. No entanto, ainda não foi realizado o desenvolvimento de um ensaio padronizado, após a comparação de diferentes metodologias.

3.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS

A identificação taxonômica de leveduras representa um desafio para a microbiologia (AGUSTINI et al., 2014). Tradicionalmente, a identificação e a caracterização das espécies de leveduras baseiam-se nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas, e características fisiológicas. No entanto, essas características são dependentes de variáveis como o meio de cultura e o tempo de

crecimento, e os testes podem apresentar resultados inconclusivos, especialmente para as leveduras. Além disso, os bancos de dados são limitados às espécies mais comuns (GUILLAMÓN et al., 1998; AGUSTINI et al., 2014).

Os procedimentos de biologia molecular apresentam-se como uma alternativa em relação aos métodos tradicionais, uma vez que são mais eficientes e apresentam maior rapidez na identificação de leveduras (GUILLAMÓN et al., 1998; ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2007).

A identificação taxonômica por PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, do inglês *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), apresenta duas etapas: a amplificação da região-alvo por meio do emprego de iniciadores específicos e a clivagem do produto obtido com endonucleases de restrição. Estas enzimas clivam o *amplicon* nas sequências palindrômicas específicas, e os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel. O perfil de fragmentação obtido é comparado com o perfil de espécies conhecidas (GUILLAMÓN et al., 1998).

Guillamón et al. (2008) identificaram 33 leveduras vínicas pela técnica de PCR-RFLP, utilizando os padrões de restrição gerados a partir da região ITS1, 5.8S e ITS2 do gene do rRNA. O tamanho dos produtos da PCR e dos fragmentos gerados pela ação das três endonucleases de restrição (*Hinfl*, *CfoI* e *HaeIII*) demonstraram que há um padrão de restrição específico para cada espécie de levedura.

A técnica de PCR-RFLP da região ITS1, 5.8S e ITS2 do gene do rRNA também foi empregada para a identificação de leveduras pectolíticas por Merín et al. (2011) e Merín et al. (2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Neste trabalho, foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137, adquirida da *ARS Culture Collection* e 164 leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná por Gaensly et al. (2015), após obtenção de autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético número 010198/2013/0. As leveduras isoladas foram denominadas numericamente, como: 1, 3, 4, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 23, 25, 29, 33, 36, 39, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 55, 105, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 134, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 166, 168, 169, 171, 172, 174, 175, 178, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 191, 192, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 206, 208, 210, 211, 215, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 230, 232, 234, 235, 236, 237, 239, 240, 241, 243, 244, 247, 248, 249, 250, 251, 253, 255, 256, 258, 260, 261, 262, 268, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278 279, 280, 281, 282, 284, 286, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 296, 297, 299, 300, 303, 304, 305, 307 e 308.

4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Para a pesagem dos componentes dos meios de cultura empregados neste trabalho, foram utilizadas a balança analítica eletrônica Bioprecisa® FA 2104N, a balança semi-analítica Shimadzu® BL 3200H ou a balança eletrônica Marte® AS2000. O pH dos meios de cultura foi verificado e ajustado utilizando o potenciômetro Tecnopon® mPA210.

Os meios de cultura foram esterilizados por calor úmido, com ou sem pressão de 1 atm, utilizando a autoclave vertical Phoenix® AV50 30 L.

4.3 ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS

A ativação das leveduras ocorreu pela transferência do conteúdo de um tubo de polipropileno contendo células de leveduras conservadas por congelamento (Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Universidade Federal do Paraná) para frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio líquido YEPD (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹, glicose 20 g.L⁻¹), pH 5,6. Após a inoculação, os frascos foram colocados na incubadora refrigerada com agitação orbital Tecnal[®] TE-421, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28 °C. Após a ativação das células, 5 mL de cultivo celular foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio líquido YEPD pH 5,6. Estes frascos de Erlenmeyer foram mantidos na mesma incubadora refrigerada, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28 °C até o final da fase exponencial de crescimento.

4.4 CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS

O cultivo contendo células recém-crescidas, obtido após a ativação e o crescimento das leveduras, foi distribuído em tubos de polipropileno estéreis. Esses tubos foram submetidos à centrifugação a 7000 xg por 5 minutos (Centrífuga Sigma[®] 1-14) e em seguida o sobrenadante de cada um dos tubos foi descartado. Ao precipitado, foram adicionados 800 µL de meio líquido YEPD pH 5,6 e 200 µL de glicerol, utilizado como agente crioprotetor. Em seguida, os tubos contendo as células foram homogeneizados e conservados a -20 °C em freezer da marca Consul[®].

4.5 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE LEVEDURAS

Células de leveduras conservadas por congelamento foram ativadas e crescidas, de acordo com o descrito no item 4.3. O cultivo de cada levedura, contendo células recém-crescidas, foi transferido para tubo de Falcon e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Sigma[®] 2-3). O sobrenadante foi descartado, e às células precipitadas foram adicionados 10 mL de água destilada estéril. As suspensões de

células foram homogeneizadas e o número de células foi quantificado por meio de contagem em câmara de Neubauer, de acordo com Tortora, Funke e Case (2012), obtendo-se o número de células totais.mL⁻¹.

4.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

Para o desenvolvimento da metodologia para a seleção de leveduras pectolíticas foram avaliados meios de cultura, reagentes de precipitação, tempos de contato do reagente selecionado e tempos para a leitura dos halos de degradação. Para estes ensaios, em cada placa de Petri contendo o meio de cultura, foram inoculados de forma pontual 10 µL de suspensão de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137. As placas recém-inoculadas foram colocadas na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.6.1 Determinação do meio de cultura, do reagente de precipitação e do tempo para a leitura dos halos de degradação

Foram avaliados três meios de cultura e três reagentes de precipitação (Tabela 3 e Quadro 2). Os meios de cultura foram preparados de acordo com o descrito no item 4.2. Após a esterilização, os meios foram distribuídos em placas de Petri de 9 centímetros.

TABELA 3 – MEIOS DE CULTURA AVALIADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

Composição dos meios de cultura (g.L ⁻¹)	
YNB-pectina	YNB 6,7; pectina cítrica 10,0 e ágar 15,0 em tampão fosfato de potássio 0,05 mol.L ⁻¹ - pH 5,0
Meio mineral contendo pectina cítrica, descrito por Merín et al. (2011)	CaCl ₂ 0,05; KH ₂ PO ₄ 0,2; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,8; (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0; MnSO ₄ 0,05; extrato de levedura 1,0; ágar 15,0; pectina cítrica 2,0, em água destilada - pH 5,0
Meio mineral contendo pectina cítrica, descrito por Moyo et al. (2003)	CaCl ₂ 0,05; KH ₂ PO ₄ 0,2; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,8; (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0; extrato de levedura 1,0; ágar 15,0 e pectina cítrica, 0,05, em água destilada - pH 5,0

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os meios de cultura apresentaram a composição conforme descrito por Merín et al. (2011) e Moyo et al. (2003), no entanto o pH dos meios foi modificado para 5,0.

A composição do YNB (base de nitrogênio para leveduras), utilizado no meio de cultura YNB-pectina, está descrita na Tabela 4. O preparo foi realizado de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante (HIMEDIA®).

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DA BASE DE NITROGÊNIO PARA LEVEDURAS (YNB)

Componentes do YNB (g.L ⁻¹)	
Sulfato de amônio	5,00
Hidrocloreto de L-Histidina	0,01
DL-Metionina	0,02
DL-Triptofano	0,02
Biotina	0,000002
Pantotenato de Cálcio	0,0004
Ácido Fólico	0,000002
Inositol	0,002
Niacina	0,0004
Ácido p-amino Benzóico (PABA)	0,0002
Hidrocloreto de Piridoxina	0,0004
Riboflavina (Vitamina B2)	0,0002
Hidrocloreto de Tiamina	0,0004
Ácido Bórico	0,0005
Sulfato de Cobre	0,00004
Iodeto de Potássio	0,0001
Cloreto Férrico	0,0002
Sulfato de Manganês	0,0004
Molibdato de Sódio	0,0002
Sulfato de Zinco	0,0004
Fosfato Monopotássico	1,00
Sulfato de Mangnésio	0,50
Cloreto de Sódio	0,10
Cloreto de Cálcio	0,10

FONTE: Fabricante: HIMEDIA®.

QUADRO 2 – SOLUÇÕES DE REAGENTES UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

Soluções de reagentes
Solução de lugol
Solução de HCl 6 mol.L ⁻¹
Solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%

FONTE: O autor (2016).

Após 96 horas de crescimento, em cada placa de Petri inoculada contendo cada um dos meios de cultura, foram adicionados 10 mL de cada uma das soluções dos reagentes testados. O tempo de contato com o reagente foi de 1 hora, em seguida foi realizado o enxague das placas utilizando água destilada. Após cada 24 horas foi verificada a formação do halo de degradação e realizada a medida dos halos utilizando paquímetro.

4.6.2 Determinação do tempo de contato com o reagente

Após a seleção do meio de cultura e do reagente de precipitação, foi realizada a determinação do tempo de contato com o reagente. Para isso, após 96 horas, nas placas de Petri inoculadas contendo o meio de cultura selecionado, foram adicionados 10 mL da solução do reagente selecionado. Os tempos de contato com o reagente avaliados foram: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 1 hora e 30 minutos. Posteriormente a este tempo de contato, foi realizado o enxague das placas utilizando água destilada. Após 24 horas foi verificada a formação de halo de degradação e realizada a medida dos halos com paquímetro.

4.7 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

Para a seleção das leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná com capacidade de produzir pectinases, foram empregadas as condições estabelecidas, incluindo o meio de cultura, o reagente de precipitação, o tempo de contato com o reagente e o tempo para a leitura dos halos de degradação.

Em cada placa de Petri contendo o meio de cultura selecionado, foram inoculados 10 μ L das suspensões de células das leveduras isoladas. As placas foram colocadas na temperatura de 28 °C, e após 96 horas foram adicionados 10 mL da solução de reagente selecionada. Posteriormente ao tempo de contato com o reagente, foi realizado o enxague das placas utilizando água destilada. Após o tempo estabelecido para a leitura, foi verificada a formação do halo de degradação e realizada

a medida do halo com paquímetro. A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 foi inoculada em cada uma das placas como controle.

Cada suspensão de células das leveduras isoladas e da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137, também foi inoculada em placa contendo o meio YEPD pH 5,6. As placas foram colocadas na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C pelo tempo de 48 a 96 horas, para verificar a viabilidade das células contidas em cada suspensão.

Os ensaios para a seleção de leveduras pectolíticas foram conduzidos em triplicata.

4.8 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS SELECIONADAS

A identificação taxonômica das leveduras pectolíticas selecionadas foi realizada em parceria com a EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). A metodologia empregada foi a PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, do inglês *Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), de acordo com o procedimento descrito por Guillamón et al. (1998) e otimizado por Agustini (2014).

Inicialmente, a suspensão de células de cada levedura selecionada foi inoculada em tubos contendo meio sólido YEPD pH 5,6. Estes tubos foram colocados na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C por 72 horas. Em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, as células foram removidas do meio de cultivo e transferidas para um tubo de polipropileno contendo água ultrapura, para o preparo de suspensão de células de leveduras, com concentração de 10^7 células.mL⁻¹. A extração do material genômico foi realizada conforme descrito por Silva et al. (2012), pelo congelamento das suspensões de leveduras a -20 °C em freezer da marca Consul®, seguido pelo descongelamento à temperatura ambiente e homogeneização.

Para a amplificação da região ITS1, 5.8S e ITS2 do gene do rRNA, foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

As reações de amplificação foram realizadas empregando o meio reacional descrito na Tabela 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A REAÇÃO DE PCR

Componentes	Concentração final
Tris-HCl (200 mM)	20 mM
Cloreto de potássio (500 mM)	50 mM
Cloreto de magnésio (50 mM)	1,5 mM
Nucleotídeos trifosfatados (1 mM)	200 µM
Oligonucleotídeos iniciadores (20 µM)	0,8 µM
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	1,5 U
DNA amostral	20 - 40 ng
Volume final	25 µL

FONTE: AGUSTINI (2014).

O termociclador Proflex® PCR System foi utilizado com o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em solução tampão de TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Para isso, 4,5 µL do produto da PCR foi homogeneizado com 2,2 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%), e em seguida foi aplicado no gel. A separação dos *amplicons* foi realizada por eletroforese a 90 V, com duração de 1 hora e 30 minutos. O marcador 100 pb (Invitrogen®) foi utilizado como referência de tamanho molecular.

Cada *amplicon* resultante foi tratado separadamente com duas endonucleases de restrição: *HaeIII* (Promega®) (5' GG↓CC 3') e *CfoI* (Sigma®) (5' C↓GCG 3'), conforme as orientações de cada fabricante. A detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% em solução tampão de TBE 1x. Para isso, 10 µL do produto da reação foi homogeneizado com 4 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%), e em seguida foi aplicado no gel.

Após a eletroforese, a revelação dos *amplicons* e do perfil de restrição, foi realizada por imersão do gel em brometo de etídeo $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 15 minutos. A fotodocumentação foi realizada sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm, utilizando o software Image Lab.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios descritos foram realizados em triplicatas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos parâmetros avaliados. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A comparação das médias obtidas foi realizada por meio do teste-t (bidirecional, two tailed). Em todas as análises, os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

5.1.1 Determinação do meio de cultura

Para os ensaios de determinação da metodologia para a seleção de leveduras pectolíticas, foi realizado o preparo de suspensão de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137, contendo 10^6 células totais.mL⁻¹.

Foram avaliados três meios de cultura: o meio YNB-pectina, o meio descrito por Moyo et al. (2003) e o meio descrito por Merín et al. (2011). A suspensão da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 foi inoculada em placas contendo cada um dos meios, de forma pontual. Após 96 horas de crescimento a 28 °C, constatou-se que houve maior crescimento celular e formação de halo de degradação no meio de cultura YNB-pectina, independentemente do reagente de precipitação adicionado (solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, solução de lugol ou solução de HCl 6 mol.L⁻¹). Dessa forma, o meio de cultura YNB-pectina foi selecionado por este ensaio, para ser empregado na seleção de leveduras pectolíticas.

A composição do meio de cultura deve proporcionar energia, carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, vitaminas e micronutrientes para suprir as necessidades nutricionais dos micro-organismos e para que haja a formação do produto desejado. Pequenas variações na composição do meio podem causar profundas modificações no crescimento celular e formação do produto (VITOLLO, 2015).

Os três meios de cultura empregados na determinação da metodologia para a seleção de leveduras pectolíticas apresentam diferentes fontes de nutrientes. Destacam-se os componentes utilizados como fonte de carbono, que foram a pectina cítrica ou a combinação de pectina cítrica e extrato de levedura, e a concentração de pectina cítrica utilizada, de 0,05 g.L⁻¹; 2,0 g.L⁻¹ ou 10 g.L⁻¹.

Diversos trabalhos já investigaram a influência da fonte de carbono na atividade de pectinase. No entanto, devido à variedade de fontes de carbono e das concentrações, os resultados não podem ser facilmente comparados (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011), assim como neste trabalho.

Para a escolha do meio de cultura, também deve-se considerar que a produção de pectinases pode ser constitutiva ou indutiva (BLANCO et al., 1999). Segundo McKay (1988), algumas leveduras secretam enzimas indutivas e utilizam os produtos da hidrólise do ácido poligalacturônico para o crescimento. Outras leveduras produzem constitutivamente as pectinases e são incapazes de utilizar os produtos da hidrólise do ácido poligalacturônico para o crescimento.

5.1.2 Determinação do reagente e do tempo para a leitura dos halos de degradação

As placas de Petri contendo o meio selecionado (YNB-pectina), inoculadas com a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137, foram avaliadas para a seleção do reagente. Após o crescimento, foram adicionados cada um dos reagentes: solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, solução de lugol ou solução de HCl 6 mol.L⁻¹. Os halos de degradação formados foram analisados, por meio de avaliação visual e pela medida do diâmetro dos halos.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se as variáveis avaliadas apresentavam distribuição normal. Os resultados das medidas dos halos de degradação formados após a adição de cada um dos reagentes testados apresentaram distribuição normal, e assim, os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

Para a leitura após 24 horas, as medidas dos halos de degradação foram determinadas e estão indicadas na Tabela 6.

TABELA 6 - DIÂMETROS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 APÓS A ADIÇÃO DOS REAGENTES

Reagente de precipitação	Diâmetro do halo de degradação (mm)
Solução de brometo de hexadeciltrimetil amônio 1%	41,8±0,21
Solução de HCl 6 mol.L ⁻¹	43,5±1,32
Solução de lugol	47,5±0,75

Dados: Média ± Desvio Padrão

FONTE: O autor (2016).

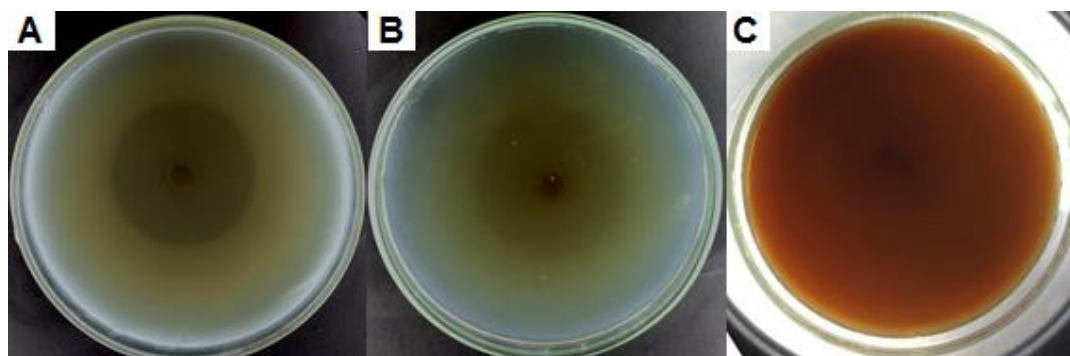
NOTA: As placas contendo o meio YNB-pectina foram inoculadas de forma pontual com 10 µL da suspensão da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137. As placas foram colocadas na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C. Depois de 96 horas de crescimento, foram adicionados 10 mL do reagente. Após 24 horas da adição do reagente, foi realizada a medida dos halos de degradação com paquímetro.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Para a comparação dos resultados, foi utilizado o teste-t (bidirecional, two-tailed), com um nível de significância de 0,05%. Os resultados indicaram que não houve diferença estatística entre a utilização do brometo de hexadecil trimetil amônio 1% e o HCl 6 mol.L⁻¹ (P=0,097), no entanto houve variação entre brometo hexadecil trimetil amônio 1% e lugol (P<0,001) e HCl 6 mol.L⁻¹ e lugol (P=0,011).

Para a leitura após 48 horas, a medida dos halos de degradação formados após a adição de HCl 6 mol.L⁻¹ foi de 41,9 ± 1,32 mm. Embora o teste-t (bidirecional, two-tailed) tenha demonstrado que não houve diferença estatisticamente significativa entre as leituras após 24 horas e 48 horas (P=0,133), o HCl 6 mol.L⁻¹ foi o único a apresentar variação no diâmetro dos halos nesses tempos de leitura. Já para a leitura após 72 horas, a medida dos halos de degradação permaneceu constante para todos os reagentes.

FIGURA 7 – HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES REAGENTES



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: A: brometo de hexadecil trimetil amônio 1 %, B: HCl 6 mol.L⁻¹, C: lugol

NOTA: As placas contendo o meio YNB-pectina foram inoculadas de forma pontual com 10 µL da suspensão da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137. As placas foram colocadas na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C. Após 96 horas de crescimento, foram adicionados 10 mL dos reagentes. A leitura das placas de Petri ocorreu após 24 horas da adição do reagente.

O brometo de hexadecil trimetil amônio precipita a pectina intacta no meio, dessa forma, os halos ao redor das colônias indicam a degradação da pectina (SCHWAN; COOPER; WHEALS, et al., 1997; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975), pela ação das pectinases microbianas. No presente trabalho, foi verificado que o brometo de hexadecil trimetil amônio apresentou-se como o melhor reagente, uma vez que permitiu a formação de halos de degradação mais nítidos, facilitando a medida. Embora os resultados não tenham demonstrado diferença estatística entre a utilização do HCl 6 mol.L⁻¹ e o brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, verificou-se que houve maior dificuldade para a leitura dos halos formados com a adição de HCl, e para este mesmo reagente houve variação das medidas após 24 horas e 48 horas.

Sendo assim, o reagente brometo de hexadecil trimetil amônio 1% foi escolhido para ser empregado na seleção de leveduras pectolíticas. O tempo escolhido para a leitura dos halos de degradação foi de 24 horas após a adição do reagente. Os ensaios demonstraram que os halos apresentaram estabilidade de 24 horas até 72 horas após a adição do reagente, portanto a leitura pode ocorrer durante esse tempo.

O brometo de hexadecil trimetil amônio vem sendo utilizado por diversos trabalhos para a seleção de leveduras pectolíticas (BIELY; SLÁVIKOVÁ, 1994; SCHWAN; COOPER; WHEALS, 1997; SILVA et al., 2005; PATHAN et al., 2010).

5.1.3 Determinação do tempo de contato com o reagente

O tempo de contato com o brometo de hexadecil trimetil amônio 1% foi determinado. Após o crescimento, nas placas de Petri inoculadas contendo o meio YNB-pectina, foi adicionada a solução do reagente selecionado, que permaneceu em contato com a superfície do meio de cultura por períodos variando de 15 minutos a 1 hora e 30 minutos. Após 24 horas foi realizada a medida dos halos de degradação.

Os resultados da medida dos halos de degradação formados após o contato com o reagente selecionado por diferentes tempos apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, e assim, os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

A leitura dos halos de degradação formados após diferentes tempos de contato com o brometo de hexadecil trimetil amônio foi realizada após 24 horas (Tabela 7).

TABELA 7 - DIÂMETROS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 APÓS DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM O BROMETO DE HEXADECIL TRIMETIL AMÔNIO 1%

Tempo de contato com o brometo de hexadecil trimetil amônio 1%	Diâmetro do halo de degradação (mm)
15 minutos	41,1 \pm 0,75
30 minutos	40,0 \pm 0,40
1 hora	40,0 \pm 0,40
1 hora e 30 minutos	40,2 \pm 0,42

Dados: Média \pm Desvio Padrão

FONTE: O autor (2016).

NOTA: As placas contendo o meio YNB-pectina foram inoculadas de forma pontual com 10 μ L da suspensão da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137. As placas foram colocadas na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C. Depois de 96 horas de crescimento, foram adicionados 10 mL da solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, que permaneceu em contato com a superfície do meio por diferentes tempos. Após 24 horas da adição do reagente, foi realizada a medida dos halos de degradação com paquímetro.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata

Para o tempo de contato de 15 minutos, a medida foi de $41,1 \pm 0,75$ mm, para os tempos de contato de 30 minutos e 1 hora a medida foi de $40,0 \pm 0,40$ mm, e para o tempo de contato de 1 hora e 30 minutos, a medida foi $40,2 \pm 0,2$ mm.

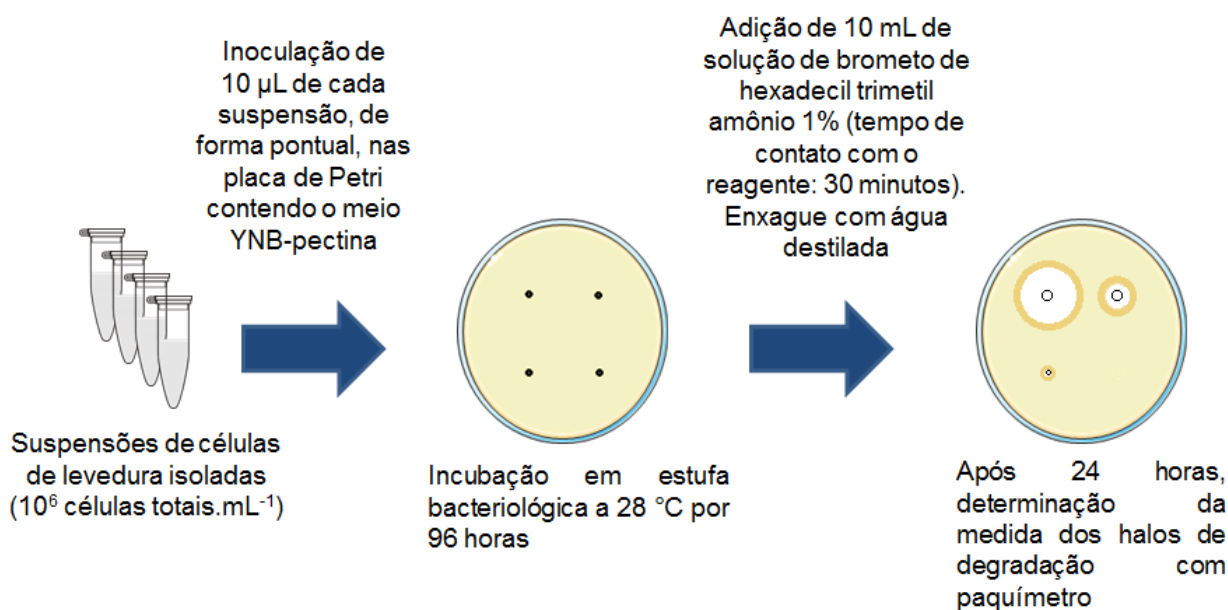
Para a comparação dos resultados, foi utilizado o teste-t (bidirecional, two-tailed), com um nível de significância de 0,05%. Os resultados indicaram que não houve diferença estatística entre os tempos de contato com o reagente.

De acordo com Biely e Sláviková (1994), o tempo necessário para a precipitação da pectina pelo brometo de hexadecil trimetil amônio é de 20 a 30 minutos. Neste trabalho foram avaliados tempos de contatos próximos ou maiores que este. Foi verificado que todos os tempos de contato avaliados podem ser empregados para a seleção de leveduras pectolíticas. O tempo de contato de 30 minutos foi selecionado, por questões práticas.

Trabalhos reportados na literatura com a finalidade de selecionar leveduras pectolíticas empregam diferentes meios de cultura, soluções de reagentes e condições de ensaio. No entanto, ainda não havia sido realizado o desenvolvimento de um ensaio para a comparação de diferentes metodologias. Essa metodologia padronizada pode permitir a comparação entre diferentes trabalhos.

Após a seleção do meio de cultura, do reagente de precipitação, do tempo de contato com o reagente e do tempo para a leitura dos halos de degradação da pectina, todas as etapas da metodologia para a seleção de leveduras pectolíticas foram definidas (Figura 8).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA PARA A SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS



FONTE: O autor (2016).

5.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTOLÍTICAS

Leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção de pectinases, por meio da metodologia desenvolvida neste trabalho. Das 164 leveduras avaliadas, 58 (35,37%) apresentaram formação de halo de degradação em meio de cultura contendo pectina cítrica como única fonte de carbono, após a adição de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%, indicando a degradação do substrato.

Strauss et al. (2001) avaliaram a produção de enzimas extracelulares por leveduras isoladas de uvas de vinhedos da África do Sul e de suco de uva clarificado. A produção de pectinases foi avaliada em meio sólido contendo ácido poligalacturônico 1,25%, fosfato de potássio 0,68%, YNB 0,67%, glicose 1% e ágar 2%, pH 3,5. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias, e em seguida foram cobertas com vermelho de rutênio 0,1%. Das 245 leveduras avaliadas, somente 9 apresentaram atividade de pectinase: *Candida stellata*, *Candida oleophila*, *Candida pulcherrima*, *Candida valida* e *Kloeckera apiculata*. Esse valor corresponde a 3,67%, porcentagem inferior à obtida

nesse trabalho. Em seu trabalho, os autores relatam que existe a possibilidade de que a presença da glicose tenha inibido a produção de enzimas por alguns dos isolados.

Merín et al. (2011) avaliaram a produção de pectinases por leveduras isoladas de uvas de diferentes distritos de San Rafael, na província de Mendoza (Argentina), em meio mineral contendo a pectina cítrica como a única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Do total de leveduras avaliadas, 55% apresentaram formação de halo de degradação após a adição de lugol. A porcentagem de leveduras pectolíticas obtida por esse trabalho é superior à encontrada neste trabalho.

É importante considerar que o meio de cultura, as condições de pH e temperatura, o tempo de crescimento e o reagente empregados nos trabalhos de Strauss et al. (2001) e de Merín et al. (2011) foram diferentes dos empregados neste trabalho, dificultando a comparação dos resultados obtidos. Além disso, por mais que as leveduras avaliadas nesses trabalhos também tenham sido isoladas de uvas, deve-se considerar que a microbiota de uvas é altamente variável. Vários fatores influenciam na microflora das uvas, como: variedade da uva, temperatura, fatores climáticos, solo, fertilização, irrigação, práticas de viticultura, estágio de desenvolvimento, danos físicos causados por micro-organismos, insetos e pássaros, e fungicidas aplicados no vinhedo (PRETORIUS, 2000).

Oliveira et al. (2006) classificaram os diâmetros dos halos de degradação resultantes do crescimento em meio sólido para a seleção de leveduras pectolíticas. Na Tabela 8 está demonstrada essa classificação, o número de leveduras deste trabalho que apresentaram cada classe de halo de degradação e a respectiva frequência relativa.

TABELA 8 – CLASSIFICAÇÃO DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA POR LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS DO ESTADO DO PARANÁ

Classificação do halo de degradação	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Número de leveduras isoladas de uvas	Frequência relativa (%)
Grande	20-30	0	0
Médio	10-20	7	12,1
Pequeno	3-10	51	87,9

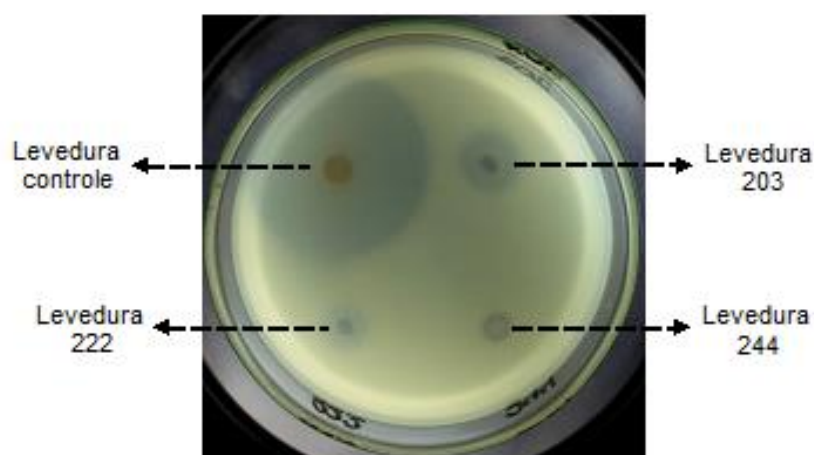
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os diâmetros dos halos de degradação foram classificados por Oliveira et al. (2006).

Neste presente trabalho, 7 leveduras apresentaram halos de degradação médios e 51 leveduras apresentaram halos de degradação pequenos, indicando a produção de pectinases por leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná. Nenhuma levedura isolada apresentou halo de degradação grande.

A Figura 9 representa os halos de degradação obtidos pela ação de pectinases da levedura controle *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 (halo de degradação grande) e de algumas leveduras isoladas de uvas: a leveduras 203 (halo de degradação médio) e as leveduras 222 e 244 (halos de degradação pequenos).

FIGURA 9 – HALOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM MEIO YNB-PECTINA PELA LEVEDURA CONTROLE E POR LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS, DENOMINADAS NUMERICAMENTE COMO LEVEDURA 203, LEVEDURA 222 E LEVEDURA 244



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A placa de Petri contendo o meio YNB-pectina foi inoculada de forma pontual com 10 µL da suspensão da levedura controle, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137, e das leveduras isoladas 203, 222 e 244. A placa foi colocada na Incubadora B.O.D. M.S.Mistura® MSM 010/G a 28 °C. Depois de 96 horas de crescimento, foram adicionados 10 mL da solução de brometo de hexadecil trimetil amônio 1%.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 foi utilizada como controle positivo, sendo inoculada em cada uma das placas para a seleção de leveduras pectolíticas. A produção de pectinases por essa linhagem já havia sido descrita por Murad e Foda (1992). Além da produção de pectinase, a levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta outras potenciais aplicações industriais, como a produção de outras enzimas, como a β -galactosidase, a β -glicosidase e a inulase; a produção de oligossacarídeos que podem ser utilizados como prebióticos; a produção de compostos aromáticos e de etanol; a biorremediação, entre outros (FONSECA et al., 2008).

Schwan, Cooper e Wheals (1997) avaliaram a produção de pectinases por leveduras isoladas da fermentação do cacau. A linhagem de *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 apresentou o maior halo de degradação formado, após o cultivo de 48 horas em meio de cultura contendo sais minerais, extrato de levedura, ácido poligalacturônico e glicose. O halo de degradação apresentou $30,0 \pm 2$ mm, tamanho inferior ao halo de degradação de menor diâmetro encontrado pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1137 neste trabalho (38,5 mm), após cultivo em meio YNB-pectina. De fato, micro-organismos da mesma espécie, porém de linhagens diferentes, podem apresentar diferentes resultados na produção de substâncias (VITOLLO, 2015).

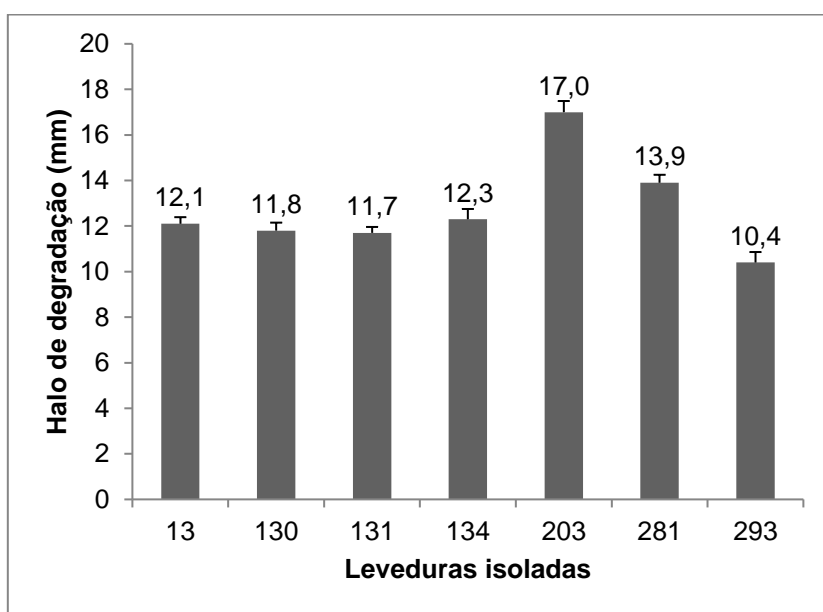
Poondla et al. (2015) isolaram leveduras de resíduos de frutas e selecionaram as leveduras com capacidade de produzir pectinase em meio YEPD, com substituição de glicose por pectina. As placas foram incubadas a 25 °C por 72 horas e em seguida ocorreu a adição de solução de vermelho de rutênio 0,02%. Cinco leveduras isoladas apresentaram atividade de pectinase. Utilizando a classificação de Oliveira et al. (2006), três leveduras apresentaram halos de degradação pequenos e duas leveduras apresentaram halos de degradação médios.

Masoud e Jerpersen (2006) avaliaram a atividade de pectinase de leveduras obtidas de amostras de café, em meio sólido contendo YNB $7,0 \text{ g.L}^{-1}$, glicose $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ e ácido poligalacturônico $5,0 \text{ g.L}^{-1}$. As placas foram incubadas a 25 °C por 48 horas e em seguida foi adicionada solução de HCl 6 mol.L^{-1} . As 12 leveduras apresentaram atividade de pectinase, demonstrada pela formação de halo de degradação. As leveduras *Pichia anomala* S16 e *Pichia kluyveri* S13Y4 apresentaram halos de degradação entre 29 e 32 mm, de acordo com Oliveira et al. (2006) classificados como

halos de degradação grandes. As demais leveduras apresentaram halos de degradação entre 7,0 e 11,0 mm.

Neste presente trabalho, foram selecionadas as leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná que apresentaram halos de degradação maiores que 10 mm: leveduras 13, 130, 131, 134, 203, 281 e 293. As leveduras selecionadas e os respectivos halos de degradação estão demonstrados na Figura 10.

FIGURA 10 - SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS DO ESTADO DO PARANÁ



FONTE: O autor (2016).

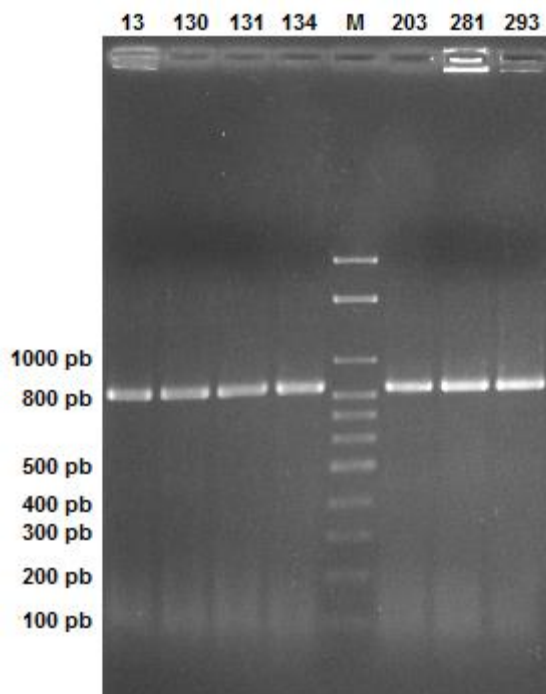
NOTA: Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. As barras representam os desvios padrões.

5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA DAS LEVEDURAS SELECIONADAS

As leveduras selecionadas foram identificadas por PCR-RFLP: leveduras 13, 130, 131, 134, 203, 281 e 293. Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificação da região ITS1, 5.8S e ITS2 do gene do rDNA.

Os produtos da PCR de todas as leveduras apresentaram em torno de 850 pares de base (Figura 11). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta tamanho próximo ao encontrado neste trabalho (Guillamón et al., 1998; Pham et al., 2011; Agustini et al. 2014), assim como as leveduras *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces pastorianus* (GRANCHI et al., 1999; Fernández-Espinar et al., 2000).

FIGURA 11 – REAÇÕES DE PCR PARA AS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS SELECIONADAS



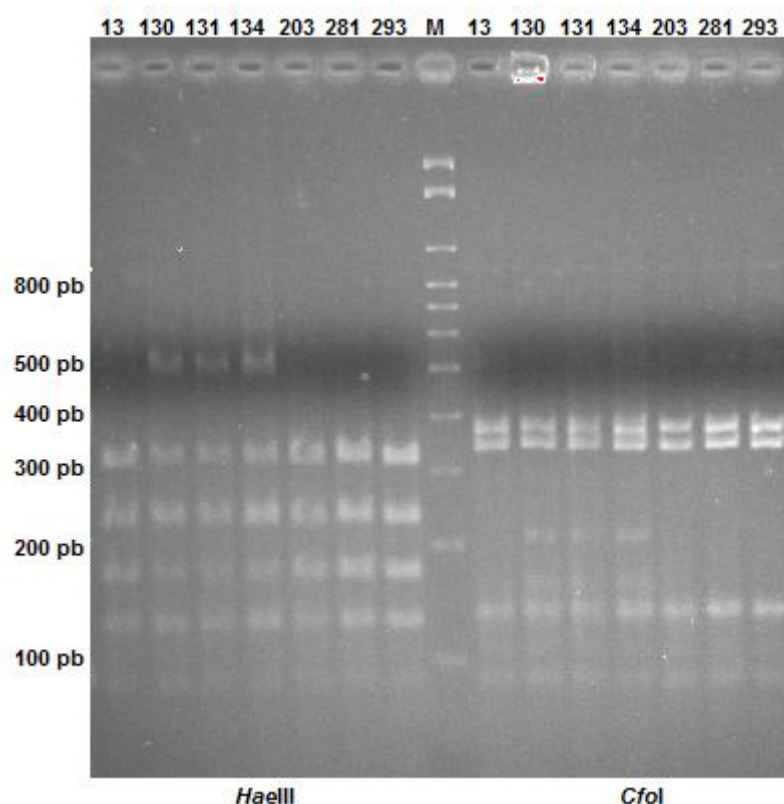
FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®)

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O gel foi corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm utilizando o software Image Lab.

Produtos da PCR de linhagens da mesma espécie ou do mesmo gênero apresentam tamanhos moleculares idênticos ou similares (GUILLAMÓN et al., 1998). Dessa forma, o tamanho do *amplicon* não é suficiente para diferenciar as espécies de leveduras. Por essa razão, o produto da amplificação de todas as leveduras, obtido com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, foi submetido à restrição enzimática utilizando as endonucleases *CfoI* e *HaeIII*.

FIGURA 12 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS PECTOLÍTICAS UTILIZANDO AS ENZIMAS *CfoI* e *HaeIII*



FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®)

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 3%. O gel foi corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm utilizando o software Image Lab.

As leveduras 13, 130, 131, 134, 203, 281 e 293 apresentaram quatro fragmentos de restrição com a enzima *HaeIII*, de aproximadamente 320, 240, 180 e 140 pb. Já com a enzima *CfoI*, as leveduras apresentaram três fragmentos de restrição, de aproximadamente 380, 360 e 140 pb (Figura 12).

Pham et al. (2011) descreve que o padrão de fragmentação obtido neste trabalho para as leveduras isoladas com a enzima *HaeIII* corresponde à levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Settani et al. (2012) descreve que o padrão de fragmentação obtido para as leveduras isoladas com a enzima *CfoI* corresponde à essa mesma espécie. Guillamón et al. (1998) obteve padrões de restrição semelhantes para essa levedura com a enzima *HaeIII*: 320, 220, 180 e 145 pb.

Em seu trabalho, Pham et al. (2011) obteve o seguintes padrões de fragmentação para outras espécies de *Saccharomyces*: *Saccharomyces paradoxus* (320, 220, 180 e 140 pb), *Saccharomyces bayanus* (495, 230 e 125 pb) e *Saccharomyces pastorianus* (320, 220, 180 e 140 pb), para a enzima *HaeIII*, e *Saccharomyces paradoxus* (385 e 365 pb), *Saccharomyces bayanus* (385 e 365) e *Saccharomyces pastorianus* (385 e 365 pb), para a enzima *CfoI*.

O uso das enzimas *HaeIII* e *CfoI* permitiu a identificação taxonômica das leveduras 13, 130, 131, 134, 203, 281 e 293 como *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que o perfil de restrição para essa espécie é diferente do apresentado por outras espécies de *Saccharomyces*.

A produção de pectinase pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi descrita em alguns trabalhos (BLANCO et al., 1997; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004; RADOI et al., 2005; MERÍN et al., 2013; LORENZO et al., 2013; POONDLA et al., 2015).

Trabalhos vêm sendo realizados para a seleção de leveduras pectolíticas (SILVA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MERÍN et al., 2011; PADMA; ANURADHA; REDDY, 2011; POONDLA et al., 2015). As leveduras apresentam vantagens em relação à produção por fungos filamentosos, uma vez que são unicelulares, seu crescimento é relativamente simples, geralmente produzem apenas um tipo de pectinase e usualmente não produzem pectina esterase (BLANCO et al., 1999; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). As pectinases obtidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* apresentam atividade de glicosidases, principalmente ramnosidase, arabinosidase, apiosidase e glucosidase, que estão relacionadas com a perda de aroma (VITOLO, 2015), além de apresentarem atividade de celulase, hemicelulase, protease e esterase (ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, al., 2011).

Este trabalho de mestrado está vinculado ao Programa de Extensão “Desenvolvimento e transferência de tecnologia para melhoria dos produtos da uva visando o fortalecimento da comunidade produtora” (PROEC 90/09). Este programa de extensão foi iniciado em 1999, visando contribuir para o desenvolvimento tecnológico dos vitivinicultores do estado do Paraná, por meio da transferência da tecnologia

desenvolvida na universidade. O emprego de leveduras isoladas de uvas capazes de produzir pectinases pode contribuir com os parâmetros sensoriais específicos dos vinhos da região, aumentando as vendas e fortalecendo a comunidade produtora.

A fermentação do mosto de uva para a produção de vinhos é um processo ecológico e bioquímico complexo, que envolve o desenvolvimento sequencial de diferentes micro-organismos. A evolução de linhagens e espécies durante a fermentação é determinada por diferentes fatores, como a susceptibilidade ao aumento de concentração de etanol, a temperatura da fermentação, o teor de oxigênio, entre outros (FLEET, 2008). Ocorre a interação de fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas, micovírus e bacteriófagos. Dentre estes micro-organismos, as leveduras possuem papel central na interação com o mosto de uvas (PRETORIUS, 2000).

Dos 100 gêneros de leveduras existentes, que representam mais de 700 espécies descritas, 15 são associadas com a produção de vinho: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (PRETORIUS, 2000).

O impacto das leveduras nas características dos vinhos vai além da fermentação dos açúcares das uvas. As leveduras produzem muitas enzimas que podem impactar o sabor e outras propriedades do vinho, como esterases, proteases, pectinases (FLEET, 2008).

A pectinase apresenta um papel importante na produção de vinhos, uma vez que está relacionada com a melhoria na maceração da casca, aumento da extração de pigmentos e de compostos aromáticos, aumento da clarificação e da filtração do mosto e melhoria da qualidade e da estabilidade do vinho (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1998; BHAT, 2000; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

As pectinases são adicionadas ao mosto de uva na etapa anterior à prensagem da uva, para a quebra de substâncias pécticas. Assim, ocorre uma prensagem mais eficiente e melhoria das operações unitárias de clarificação e filtração, que ocorrem mais rapidamente (VITOLLO, 2015).

A obtenção de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de produzir pectinase e liberar substâncias corantes e/ou aromáticas, possibilitaria acoplar a clarificação e a fermentação, resultando em considerável economia de tempo de processo na produção de vinho (VITOLLO, 2015). Os resultados obtidos por este trabalho apresentam um indicativo da contribuição na produção de vinho pelas leveduras pectolíticas selecionadas. Estudos relacionados com a caracterização e a produção enzimática pelas leveduras selecionadas são necessários, assim como a avaliação do impacto nos aspectos sensoriais do vinho, como aroma e cor.

6 CONCLUSÃO

A padronização de diversos parâmetros da metodologia otimizada permitiu a seleção de leveduras pectolíticas. Das 164 leveduras isoladas de uvas do estado do Paraná avaliadas, 58 (35,37%) apresentaram formação de halo de degradação, indicando a degradação da pectina e a provável produção de pectinases. Os sete isolados selecionados foram identificados pela técnica de PCR-RFLP como *Saccharomyces cerevisiae* e podem ser de interesse para a produção de vinhos.

REFERÊNCIAS

- ADAPA, V.; RAMYA, L. N.; PULICHERLA, K. K.; RAO, K. R. S. S. Cold Active Pectinases: Advancing the Food Industry to the Next Generation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, p. 2324–2337, 2014.
- AGUSTINI, B. C. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF**. 125 f. Tese - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C. B.; BONFIM, T. M. B.; SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v.98, p. 5645–5654, 2014.
- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1525–1537, 2011.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes : a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21–28, 1998.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; FLÓREZ, A. B.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; MAYO, B. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 961–967, 2007.
- BARNBY, F. M.; MORPETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 11, p. 891–897, 1990.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, p. 355–383, 2000.
- BIELY, P.; SLÁVIKOVÁ, E. New search for pectolytic yeasts. **Folia microbiologica**, v. 39, n. 6, p. 485–488, 1994.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; REBOREDO, N. M.; VILLA, T. G. Genetic determination of polygalacturonase production in wild-type and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of microbiology**, v. 167, n. 5, p. 284–288, 1997.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 1–9, 1999.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.1020-1025, 2002.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149–157, 2012.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; MANZANARES, P.; RAMÓN, D.; QUEROL, A. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. **International Microbiology**, v. 1, p. 143–148, 1998.

FEDERICI, F. Production, purification and partial characterization of an endo-polygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 51, n. 2, p. 139–50, 1985.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; QUEROL, A.; BARRIO, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rDNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.78, p.87-97, 2000

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; UBEDA, J. F.; VASUDEVAN, T. G.; CORDERO OTERO, R. R.; BRIONES, A. I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 2, p. 261–266, 2004.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.979-995, 2008.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 339–354, 2008.

GAENSLY, F.; AGUSTINI, B. C.; SILVA, G. A.; PICHETH, G.; BONFIM, T. M. B. Autochthonous yeasts with β -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. **Journal of Functional Foods**, p. 288-295, 2015.

GAINVORS, A.; NEDJAOUM, N.; GOGNIES, S.; MUZART, M.; NEDJMA, M; BELARBI, A.. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 131–135, 2000.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.949-956, 1999

GUILLAMÓN, M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives Microbiology**, p. 387–392, 1998.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987–996, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, 1975.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, v. 153, p. 384–395, 2010.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409–418, 2002.

IRSHAD, M.; ASGHER, M.; ANWAR, Z.; AHMAD, A. Biotechnological Valorization of Pectinolytics and Their Industrial Applications: a Review. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 11, p. 1649–1654, 2014.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, p. 215–227, 2001.

LIM, J.; YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y.; OZAWA, J. Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 473–480, 1980.

LORENZO, F.; VIVIANA, C.; ALESSIO, G.; MARINA, B.; SERGIO, C. Grape marcs as unexplored source of new yeasts for future biotechnological applications. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 155115–62, 2013.

LUH, B. S.; PHAFF, H. J. Properties of yeast polygalacturonase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 48, n. 1, p. 23–37, 1954.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 291–296, 2006.

MCKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, p.355-358, 1988.

MERÍN, M. G.; MENDOZA, L. M.; FARÍAS, M. E.; AMBROSINI, V. I. M. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 144–148, 2011.

MERÍN, M. G.; MENDOZA, L. M.; AMBROSINI, V. I. M. Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. **Journal of Basic Microbiology**, p. 1–8, 2013.

MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**, p. 62–74, 2005.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine chemistry and biochemistry**. 1 ed. Nova Iorque: Springer, 2009.

MOYO, S. GASHE, B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p.87-100, 2003.

MURAD, H. A.; FODA, M. S. Production of Yeast Polygalacturonase on Dairy Wastes. **Biosource Technology**, v.41, p.247-250, 1992.

OLIVEIRA, K. F.; MALAVOLTA, L.; SOUZA, C. S.; VICENTE, E. J.; LALUCE, C. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 633–640, 2006.

PADMA, P. N.; ANURADHA, K.; REDDY, G. Pectinolytic yeast isolates for cold-active polygalacturonase production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 2, p. 178–181, 2011.

PATHAN, A. A. K.; BHADRA, B.; BEGUM, Z.; SHIVAJI, S. Diversity of Yeasts from Puddles in the Vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and Bioprospecting for Enzymes and Fatty Acids. **Current Microbiology**, v. 60, p. 307–314, 2010.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9–18, 2009.

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II . A structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, p. 109–121, 2003.

PHAM, T.; WIMALASENA, T.; BOX, W. G.; KOIVURANTA, K.; STORGARDS, E.; SMART, K. A.; GIBSON, B. R. Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery “Wild” Yeast Contaminants. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 556–568, 2011.

POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM, R.; OBULAM, V. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 70–76, 2015.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, p. 675–729, 2000.

RADOI, F.; KISHIDA, M.; KAWASAKI, H. Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.663-668, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **The microbiology of wine and vinifications**. 2 ed. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929–967, 2001.

SAHAY, S.; HAMID, B.; SINGH, P.; RANJAN, D.; CHAUHAN, D.; RANA, R. S.; CHAURSE, V. K. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 2, p. 115–121, 2013.

SANCHEZ, J.; GUIRAUD, J. P.; GALZY, P. A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 262–267, 1984.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 234–244, 1997.

SETTANNI, L.; SANNINO, C.; FRANCESCA, N.; GUARCELLO, R.; MOSCHETTI, G. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.114, n.6, p.606-614, 2012.

SILVA, E. G. DA; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 9, p. 859–865, 2005.

SILVA, G. A. D.; BERNARDI, T. L.; SCHAKER, P. D. C.; MENEGOTTO, M.; VALENTE, P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 319-327, 2012.

STRAUSS, M. L.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 1, p. 182–190, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UENOJO, M.; PASTORE, M. G. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VAUGHN, R. H.; JAKUBCZYK, T.; MACMILLAN, J. D.; HIGGINS, T. E.; DAVÉ, B. A.; CRAMPTON, V. Some pink yeasts associated with softening of olives. **Applied microbiology**, v. 18, n. 5, p. 771–775, 1969.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

YOSHITAKE, S.; NUMATA, T.; KATSURAGI, T.; HOURS, R. A.; SAKAI, T. Purification and Characterization of a Pectin-Releasing Enzyme Produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 370–375, 1994.

VITOLO, M. **Biotecnologia Farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blücher, 2015.